

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 探討弱化 YTHDC2 基因是否影響 CUG 重複序列進而使之 *
* 名稱 : 毒性降低 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 溫振宇
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-033-B
研究期間： 106 年 07 月 01 日至 107 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指導教授： 潘惠錦

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 107 年 04 月 03 日

(一)摘要

在肌強直型肌肉萎縮症(Dystrophia myotonia, DM)中，DMPK基因轉錄的3' UTR mRNA上有CUG重複序列擴增，在細胞核內muscleblind (MBNL)會和CUG重複序列結合堆積形成foci，導致下游的基因剪接異常，而形成DM疾病。Helicase是在DNA複製、轉錄、轉譯、重組、DNA修復和核糖體合成等涉及核酸鏈分離的一種酵素。先前實驗指出在帶有CUG重複序列125次的線蟲弱化F52B5.3基因，可使線蟲的GFP表現量明顯下降；在線蟲的肌肉方面，肌肉束從異常的波浪狀回復到正常的平滑狀，其爬行速率也有回升的跡象。目前實驗室已建立兩種DM1模式，分別在小鼠肌纖維母細胞C2C12與斑馬魚中表達擴增的CUG重複序列。C2C12-CUG200細胞無法誘導分化形成myotube；而在DM1斑馬魚模式中CUG重複序列造成斑馬魚的肌肉結構與游動行為異常。F52B5.3 RNA解旋酶對應到人類的同源基因為YTHDC2(YTH Domain Containing 2)，歸類在SF2家族DEAH-box解旋酶。因此，我探討在CUG200的細胞中，弱化YTHDC2基因是否能讓C2C12-CUG200細胞回復分化能力，並讓肌肉相關蛋白表現回復。另外，我將利用CRISPR/Cas9這項技術在DM1模式斑馬魚中剔除YTHDC2基因，希望未來能以組織切片和phalloidin染色觀察肌肉組織結構，並分析泳動行為來探討在DM1模式斑馬魚上是否可回復CUG重複

序列所造成之異常。

(二)序論

強直型肌肉萎縮症(DM)是一種體染色體顯性神經肌肉方面的遺傳疾病，其病因是由於 CUG 異常擴增突變所造成，至今仍無有效的治療方式。在臨床症狀的表現主要包括肌強直、肌肉(臉部、頸部和四肢)無力及漸進性萎縮等。除此之外也可能影響眼睛、腦、皮膚、肺、心臟等器官以及內分泌系統，進而造成白內障、智能不足、禿頭、肺炎、心臟傳導缺陷、糖尿病和男性不孕等症狀，所以屬於多系統的神經肌肉疾病(multi-systemic disease)[1]。DM 依據其突變位置不同可分為兩類 DM1 及 DM2[2]。DM1 是由於人類第十九對染色體長臂(19q13.3)上的 dystrophia myotonica-protein kinase (DMPK)基因之 3' -untranslated region(3' -UTR)內一段 CTG 三聯核酸重複序列發生不正常擴增所導致[3][4]。DM2 則是由於人類第三對染色體長臂(3q21)上的鋅手指蛋白(zinc finger protein-9, ZNF9)基因之第一個內含子(intron)內帶有 CCTG 四聯核酸重複序列(約 75 到 11000 次)所導致疾病症狀的發生[5]。文獻指出在 DM 疾病會影響到 RNA 結合蛋白質(RNA binding protein, RBPs)，包括 CUG-binding protein 1 (CUGBP1)和 muscleblind-like protein 1 (MBNL1) 的功能，而這兩種 RNA 結合蛋白質都具有調控 mRNA 剪接

(splicing)的功能，因此當 CUG 重複序列的擴增時會造成下游基因剪接異常，包含 cardiac troponin T(cTNT)、chloride channel (CLCN1)和 insulin receptor(IR)基因等[6][7]。過去文獻指出 CG-rich 序列的基因表達需要某些因子的存在，當這類轉錄因子相關的基因被弱化時會使得重複序列不易被轉錄，導致重複序列的表現量下降[8]。因此實驗室開始尋找不影響正常基因表現但在致病基因中擴增 CUG 重複序列表達過程中必需的因子。利用已建立好的轉殖線蟲作為動物模式，以大量篩選 RNAi library 的方式找出擴增 CUG 重複序列表現所需要的基因，並探討弱化此基因是否能降低擴增 CUG 重複序列毒性，而不會造成正常線蟲的異常。F52B5.3RNA 解旋酶與人類 YTHDC2 為同源基因，歸類在 SF2 家族 DEAH-box 解旋酶，此解旋酶的機制尚未明確。在過去的文獻中，發現解旋酶參與在三聯擴增重複序列中，DDX6 為 DEAD-box 解旋酶，會結合在擴增的 RNA 上並有解開雙股 RNA 的功能。此外當大量表現 DDX6 時，細胞核中的 foci 有減少的現象，並釋放困在 foci 中的 MBNL 蛋白質恢復其原本剪接的功能[9]。但在其他文獻又指出，DDX5 會結合在擴增重複序列的 RNA 上，進而造成 MBNL 蛋白質的結構改變並在細胞核內形成 foci，並導致下游剪接異常造成 DM1 疾病[10]。為了進一步探討還有哪些解旋酶會影響擴增重複序列的表達，在 Wormbase、NCBI 及文

獻[11]等，發現線蟲大約有 140 個 DNA、RNA 解旋酶基因。而這 140 個解旋酶基因當中，102 個解旋酶基因在 RNAi library 中被找到，並且當中有 63 個與人類為同源基因，而剩餘的 38 個解旋酶基因中有 34 個與人類為同源基因，挑選與人類為同源基因是利於後續進入細胞模式。

解旋酶(Helicase)是所有生物體維持生命所必須的一類酵素，屬於一種馬達蛋白 (motor protein)，利用三磷酸腺苷 (ATP) 水解產生的化學能量轉換為動能，有方向性的沿著核酸的磷酸二酯骨架移動，並將雙股 DNA 或雙股 RNA 解開[12]。解旋酶可分為 DNA 解旋酶與 RNA 解旋酶，DNA 解旋酶針對於 DNA 的複製、修補和重組，RNA 解旋酶則作用在轉錄、轉譯和 RNA 剪切。當解旋酶出現異常時，會造成細胞增殖及基因異常表現等[13]。

在過去 10 年中，morpholino anti-sense oligonucleotides 是普遍用於斑馬魚中弱化特定基因的技術[14]，現今有 CRISPR/Cas9 這項技術能夠更快速且有效的剔除目標基因，其副作用的影響相對也大幅降低。CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/ CRISPR associated protein 9) 為目前發現存在於大多數細菌與所有的古菌中的一種後天免疫系統，其會辨認外來的 DNA 並加以切割降解，以消滅外來的

質體或者噬菌體，並在自身基因組中留下外來基因片段作為記憶。

近年來陸續解開了 Cas9 對於目標 DNA 的辨認機制，文獻指出，Cas9 會與其導引 RNA (small-guiding RNA) 結合後得到辨認目標序列的能力，進而結合並切割目標 DNA，只需要修改導引 RNA 的序列，即可改變 Cas9 的專一性，命令其轉而裁切另一不同序列的 DNA[15]。

藉由觀察斑馬魚型態上的改變、螢光分析、病理切片等方法，發現含 181 次 CUG 重複序列的魚在胚胎時期就出現了發育遲緩的現象，一個月大的幼魚也出現游動時身體會顫抖、捲曲的發病情形，另外在病理切片中的肌肉束也出現和 DM 病人相同的核內化現象。因此，我將利用實驗室建立之 DM1 疾病模式斑馬魚，藉由 CRISPR/Cas9 系統剔除 YTHDC2 基因後，是否對斑馬魚肌肉功能有改善作用。

(三)材料與方法

1. 慢病毒製備及慢病毒感染

(1)將 5×10^6 個 HEK293T細胞種至培養皿中，隔天吸除培養液，以PBS清洗後加入10ml培養液，並配製質體混合物($8.1 \mu\text{g}$ pCMV- Δ R8.91、 $0.9 \mu\text{g}$ pMV .G、 $9 \mu\text{g}$ YTHDC2 plasmid)於1.5ml tube中混合均勻，並補d₂H₂O 至體積450 μl ，再緩慢加入12.5mM CaCl₂ 靜置5分鐘、再加入2X HEPES-Buffered Saline(HBS;Promega)到tube中並靜置7分鐘，接著混合液滴入10cm培養皿中，置於培養箱中培養

10小時後，移除舊的培養液，以PBS緩衝液清洗後，換成新的培養液。放入培養箱48小時，再以 $0.45\ \mu\text{m}$ 的 filter(PVDF member)過濾培養液至15c. c. 離心管中。感染C2C12的病毒液需進行病毒濃縮，體積比 Lenti-X™ Concentrator：病毒濾液=1：3，混合後於 4°C 反應 overnight，再以 4°C 離心1500g、45分鐘，移除上清液，以 $100\ \mu\text{l}$ 回溶即是濃縮100倍的病毒液，存放於 -80°C 。

(2)將 4×10^4 個C2C12細胞種於6cm dish中，再加入 $8\ \mu\text{g/ml}$ polybrene到培養液中，接著加入 $100\ \mu\text{l}$ 濃縮病毒液進行感染，隔天換成新的培養液，讓細胞進行復原(recover)一天，感染後第二天將培養液換為含有 $2\ \mu\text{g/ml}$ puromycin培養液，篩選七天可得 stable YTHDC2 cell line。

2. Western blot

將transfection後的細胞移除medium，用PBS清洗三次。加入RIPA Buffer $80\ \mu\text{l}$ ，放置冰上10分鐘，將細胞刮下收至新的離心管。以超音波震碎細胞，離心12000rpm、 4°C 10分鐘，將上清液移至新的離心管。經由SDS-PAGE電泳膠體，將蛋白質轉到PVDF膜上，用7%的脫脂牛奶溶於TBST室溫一小時，TTBS清洗三次、10分鐘。一抗抗體以1X casine稀釋， 4°C 隔夜，MyoD 1:1000 MHC1:2000，actin 1:5000， 4°C 處理隔夜。隔日，TTBS清洗3次、10分鐘。加入二抗抗

體，濃度為1:5000溶於1X casine裡，室溫處理1小時後，TTBS清洗三次、10分鐘。利用Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrateKit呈色，以冷光螢光數位分析系統進行冷光測定。

3. CRISPR/Cas9製備及microinjection

A. CRISPR/Cas9 guide RNA 設計

在YTHDC2設計一段sgRNA(<https://benchling.com/editor>)(Nature Biotechnology 34, 184 - 191. 2016)，並在Sense guide oligo與 Antisense guide oligo各取1 μ l，利用PCR machine進行 annealing(37°C 30分，95°C 5分，之後1分下降5°C，下降至5°C)。

B. Synthesis of gRNA and Cas9 mRNA

(1) 製備gRNA：利用XhoI使pT7-gRNA vector (RNAi Core)線性化，經膠回收後，使用MEGashortscript T7 kit(Ambion-Invitrogen)系統在體外定向轉錄DNA並純化，取1 μ g作為模板並加入2X NTP/CAP 10 μ l、10X Reaction buffer 2 μ l、Enzyme mix 2 μ l，最後以 Nuclease-free水補至總反應體積20 μ l。在37°C下反應3小時，以 TURBO Dnase37°C處理15分鐘去除DNA模板。酒精沉澱後離心，烘乾 pellete，加入30 μ l Nuclease-free水回溶並定量，保存於-80°C。

(2) 製備Cas9 mRNA：將pCS2 plus vector(Addgene)透過NOTI使其線性化，膠回收後使用mMESSAGE mMachine(Ambion)系統在體外定向

轉錄DNA並純化。

C. Microinjection into Zebrafish Zygote

將1ml含有gRNA (80 ng/ μ l)和純化後的Cas9 mRNA (150 ng/ μ l)的混合溶液，利用顯微注射打入單細胞階段時期的斑馬魚胚胎中。

D. 利用T7 endonuclease I assay (New England BioLabs)，來進行突變基因體的檢測[20]，PCR放大出帶有突變位點(如CRISPR/Cas9的target site)DNA 片段，將突變DNA與控制組DNA混合，進行加熱denature、annealing複性處理後，加入T7E1酶，37°C反應15 min後，跑2%的DNA Agarose gel電泳檢測分析酶切結果。

(四)結果

DM1疾病模式之肌肉異常

在實驗室所建立之DM1疾病模式中，實驗室學長姐發現許多因重複序列擴增所引起的肌肉異常現象。首先在 C2C12 細胞株中，處理分化培養基3天的 CUG200 細胞並不會像控制組一樣分化並形成 myotube (Fig. 1)。另外在斑馬魚疾病模式中，5天大之胚胎顯示，肌肉結構鬆散且有空洞(Fig. 2. A)。利用Ethovision分析其游動能力也發現5天大之胚胎，相較於控制組，游動3分鐘內總距離下降亦即行為能力下降(Fig. 2. B)。

弱化YTHDC2基因可回復DM1細胞生長及分化能力

DNA/RNA解旋酶(Helicase)可以將DNA雙股螺旋或自我黏合的RNA分子解開，是一種進行許多細胞代謝過程所必需的酶。先前實驗室的研究發現擴增CUG重複序列對生物體的毒性可藉由降低其表現量而緩和，而F52B5.3 RNA解旋酶對應到的人類同源基因為YTHDC2。在CUG0、CUG125線蟲將單一的解旋酶F52B5.3基因弱化利用定量RT-PCR分析F52B5.3基因表現量，與對照組相比，確認CUG0和CUG125線蟲的F52B5.3基因表現量有明顯減少 (Fig. 3)，並且利用phalloidin staining觀察肌肉結構，CUG0線蟲組別中其肌肉束為平滑狀；CUG125線蟲組別中其肌肉束為波浪狀，代表為異常的肌肉結構，而餵食F52B5.3基因的CUG125線蟲其肌肉束恢復為較平滑狀(Fig. 4)。實驗室將CUG200次重複序列選殖至pEGFP-N3的載體，並轉染至C2C12，以建立表達CUG重複序列模擬疾病(以下簡稱(CUG)200)，而pEGFP-N3則做為控制組(以下簡稱N3)。接下來我將N3與CUG200細胞，利用慢病毒製備病毒液後感染，弱化YTHDC2基因後，抽取其RNA轉成cDNA後利用PCR確認弱化的效率，結果顯示約為5成(Fig. 5)。接著將有弱化與未弱化的N3和CUG200處理分化，發現分化第5天及7天有弱化之N3細胞與未弱化之N3細胞生長情況相似，且皆有分化；但未弱化之CUG200細胞在第7天因無法分化而死亡，有弱化之CUG200細

胞卻有明顯的分化情形且死亡率下降(Fig. 6A. B)。由結果可知弱化 helicase 基因不會影響沒有重複序列的細胞，只會專一性作用在重複序列上，並且能使因重複序列造成無法分化的情況有所改善。

設計在DM1斑馬魚中剔除YTHDC2基因的gRNA，並建構clone

利用 CRISPR/Cas9 在 DM1 疾病斑馬魚中剔除 YTHDC2 基因，觀察是否能降低 CUG 重複序列所造成的毒性，讓其肌肉細胞型態回復正常，一開始我設計出三段 YTHDC2 基因的 guide RNA(Fig. 7)，並利用 BsmBI 接入 T7-sgRNA 載體中，使用 pCS2-Cas9 和接入 giude RNA 的 T7-sgRNA 轉錄出 mRNA 後再打入斑馬魚胚胎中(Fig. 8)，但在使用 IVT 轉錄出 mRNA 時極為不穩定，以至於無法操作後續的 microinjection，因此我後來決定使用另一套系統，利用 BseR1 將設計的 gRNA 接入 pDest Tol2CG2-U6 gRNA - zmy1z-Cas9-polyA (Fig. 9)載體，接著再使用 EcoR1-HF 酵素切質體(Fig. 10A)以及使用 primer(ZF1+gRNA antisense)進行 PCR 確認是否有將 gRNA 接入載體中(Fig. 10B)。

(五)未來展望

斑馬魚研究興起，由於其飼養方便、操作簡單、胚胎呈現透明利於觀察，且跟人類都屬於脊椎動物，比線蟲及果蠅較為高等，尤其斑馬魚子代數目遠多於小鼠，有利於做大量且快速的藥物篩檢。藉由觀察斑馬魚型態上的改變、螢光分析、病理切片等方法，發現含181次CUG重複序列的魚在胚胎時期就出現了發育遲緩的現象，一個月大的幼魚也出現游動時身體會顫抖、捲曲的發病情形，另外在病理切片中的肌肉束也出現和DM病人相同的核內化現象。先前研究顯示在CUG125線蟲弱化F52B5.3後，可以回復CUG125線蟲的爬行速率(body bends)以及其肌肉發育。為了探討弱化YTHDC2基因後，是否可以在更高等的脊椎生物上有相同的影響，未來希望能將實驗室DM1模式斑馬魚藉由CRISPR/Cas9剔除YTHDC2基因後，探討是否對於肌肉結構和功能有改善作用。

(六)圖表

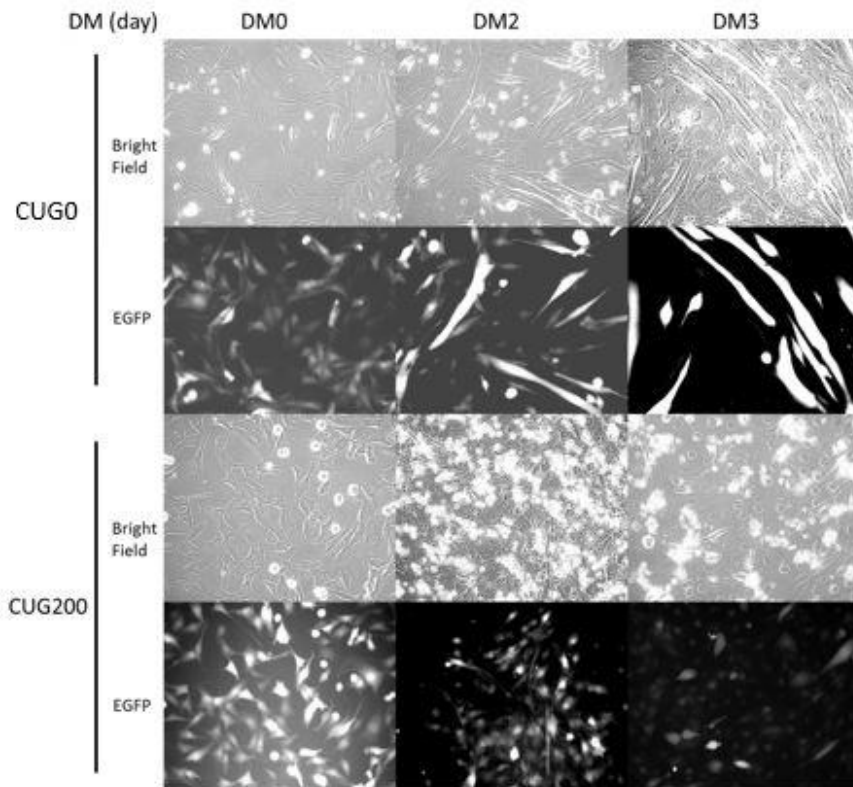


Fig.1 C2C12-CUG0 細胞與 CUG200 細胞，在分化後第三天時，CUG0 細胞明顯有 myotube 的生成，然而在 CUG200 細胞中並沒有生成 myotube。(From 曾珮萁)

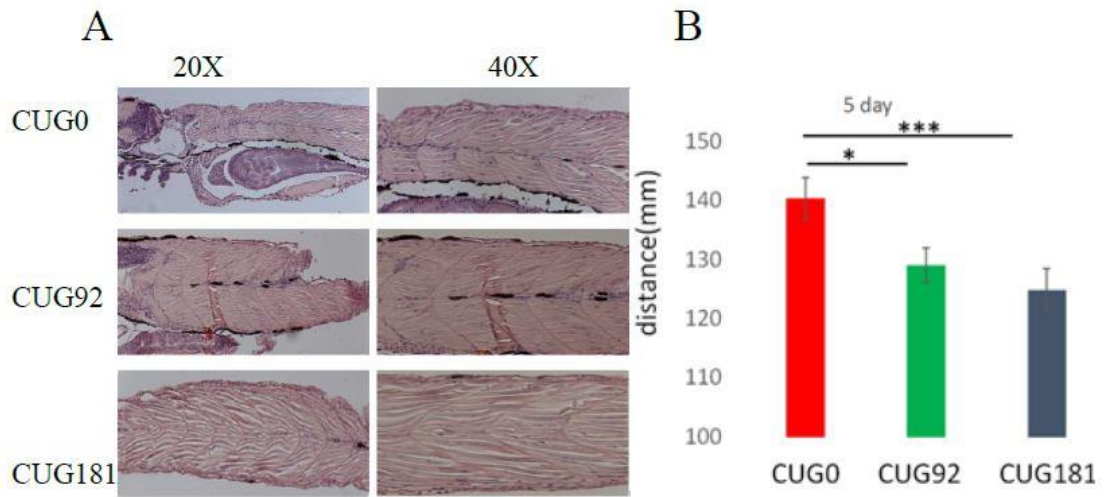


Fig. 2 A在DM1模式斑馬魚第五天切片中可發現，CUG重複次數愈多，肌肉結構愈鬆散。B實驗室建立不同CUG重複次數之斑馬魚模式，分為0、92、181次。上右圖表為斑馬魚在5天大時，游動距離之統計，重複次數愈多之斑馬魚游動行為能力愈差。

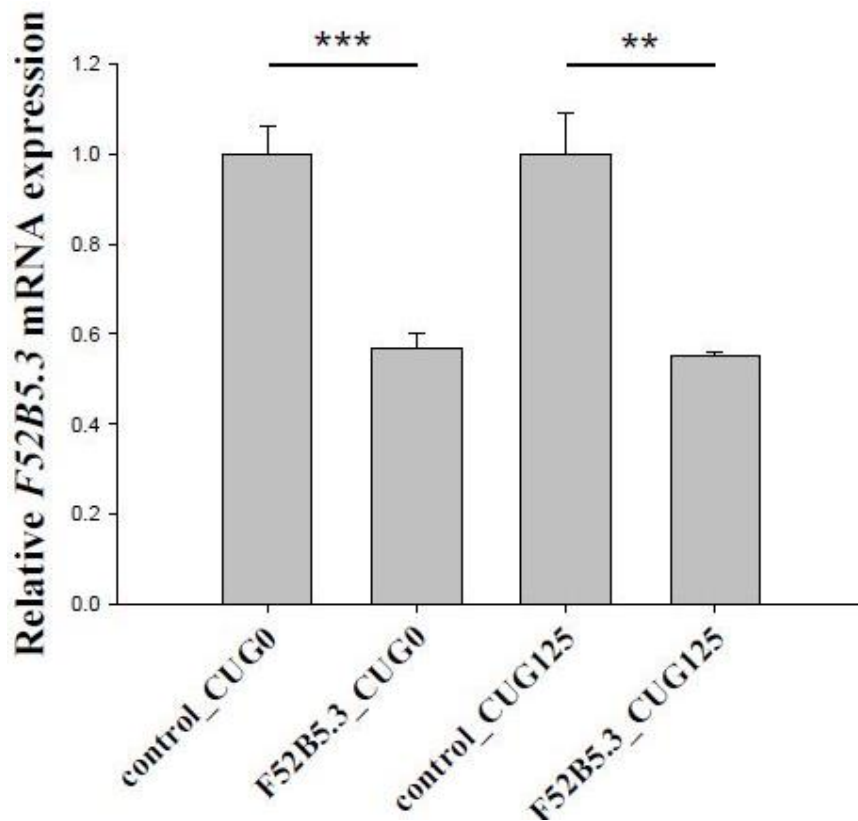


Fig. 3 利用定量 RT-PCR 進一步確定 RNAi 餵食後確實會減少

F52B5.3 基因的表現量。經 F52B5.3RNAi clone 處理後，不論在 CUG0 或 CUG125 線蟲中，實驗組的 F52B5.3 表現量相對於對照組有明顯減少。(From 鄭雅仍)

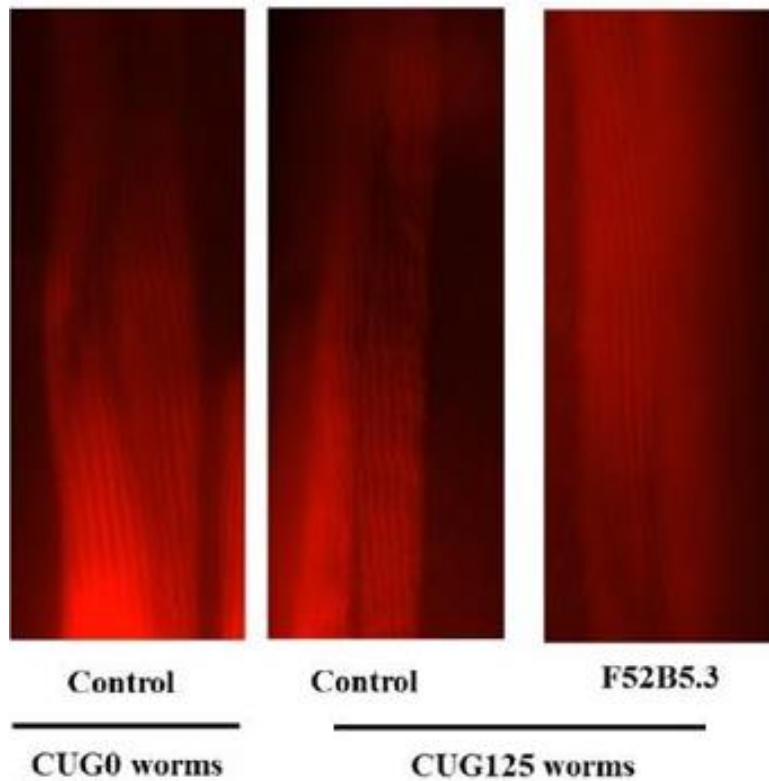


Fig. 4 F52B5.3 基因可回復 CUG125 線蟲的異常肌肉細胞。利用 phalloid 染色觀察肌肉結構，CUG0 線蟲組別中其肌肉束為平滑狀；CUG125 線蟲組別中其肌肉束為波浪狀，代表為異常的肌肉結構，而餵食 F52B5.3 的 CUG125 線蟲組別中其肌肉束恢復為較平滑狀。(From 鄭雅仍)

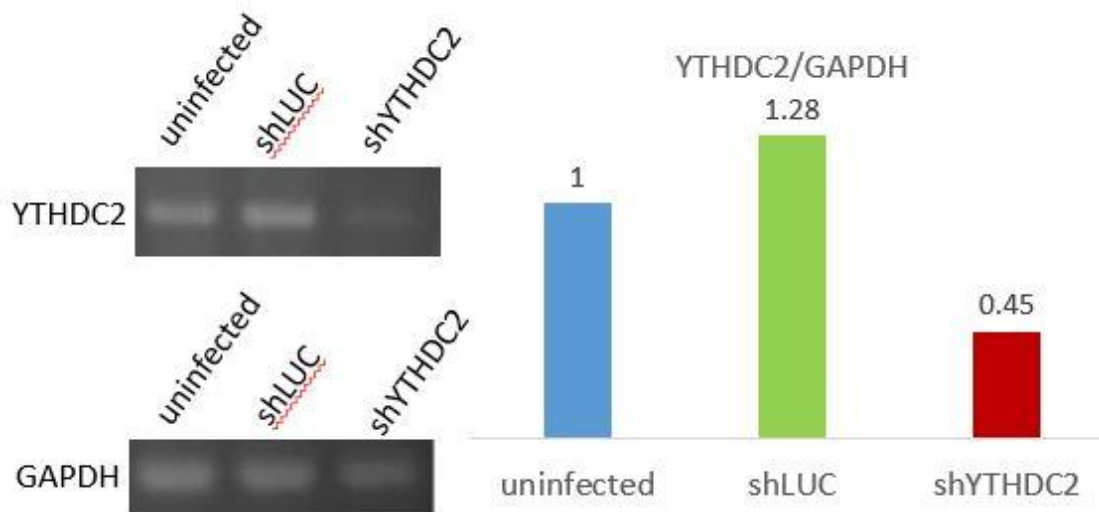


Fig. 6 將C2C12-CUG200弱化YTHDC2基因經過PCR跑膠後之YTHDC2及GAPDH表現量(GAPDH為internal control)。經由imagej定量分析後，其弱化效率約為5成。

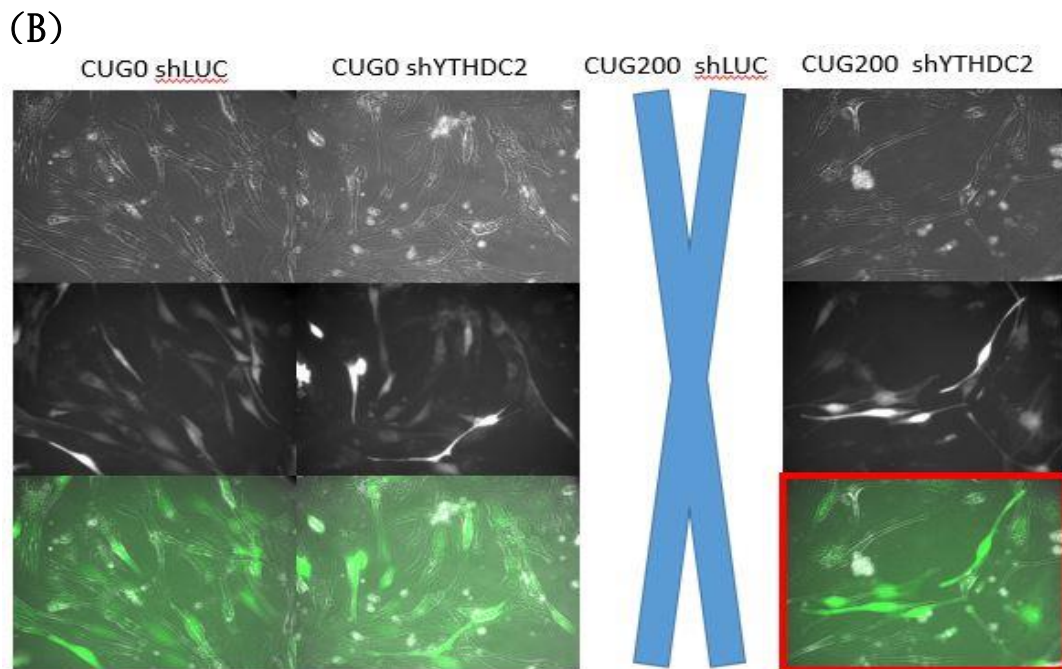
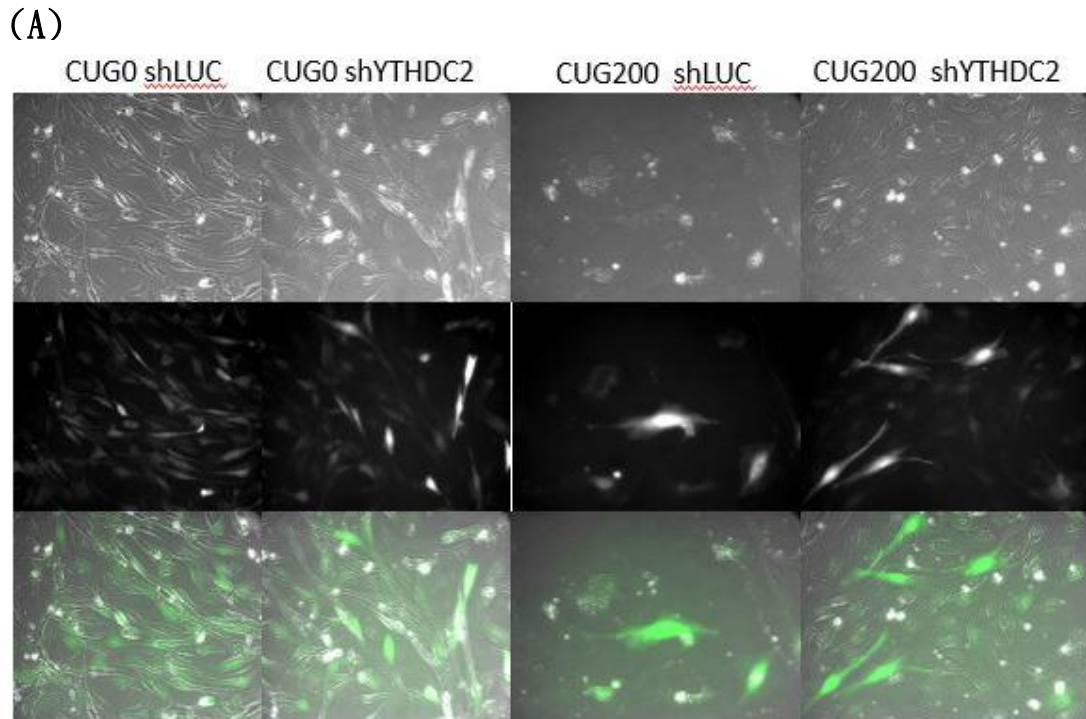


Fig. 6 (A) CUG200細胞分化後第5天的細胞狀態 (B)CUG200細胞分化

後第7天的細胞狀態，在N3中，細胞的生長狀態正常且有拉長分化之情形；但在CUG200中，未弱化YTHDC2基因細胞無法分化且死亡，但在有弱化之細胞發現明顯分化情形。

YTHDC2 guide RNA	
5'	- GGACATCAGGATCGACGAAGGT -3'
5'	- CTTCGTGCATCCTGATGTCTGA -3'
5'	- GATCGCTGTCAACATCGCCCGT -3'
5'	- GGGCGATGTTGACAGCGATTGA -3'
5'	- GCGTCCTTGACAAACTCTGAGT -3'
5'	- TCAGAGTTTGTCAAGGACGAGA -3'

Fig. 7 利用生物資訊網站設計YTHDC2基因三段重要區域的guide RNA 序列。

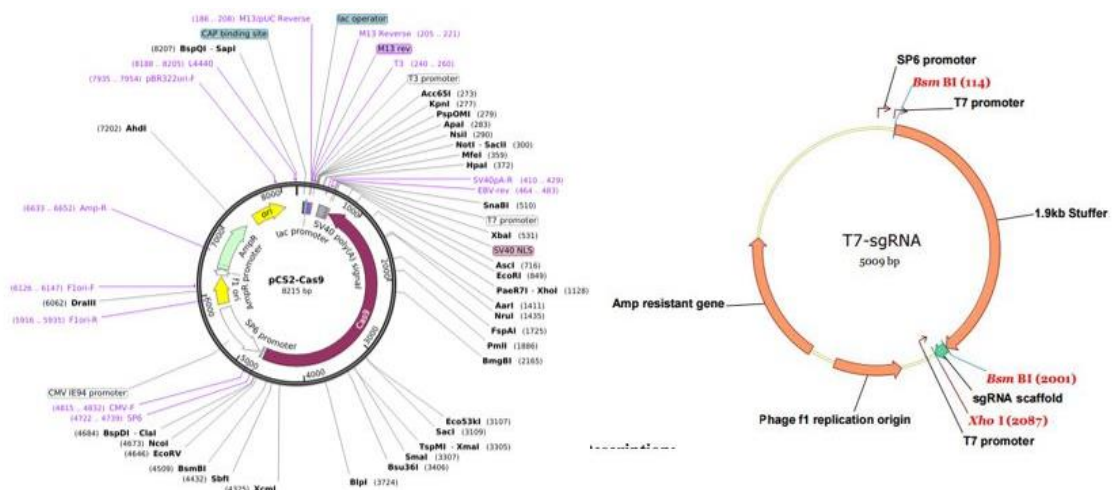


Fig. 8 pCS2-Cas9質體與T7-sgRNA質體。

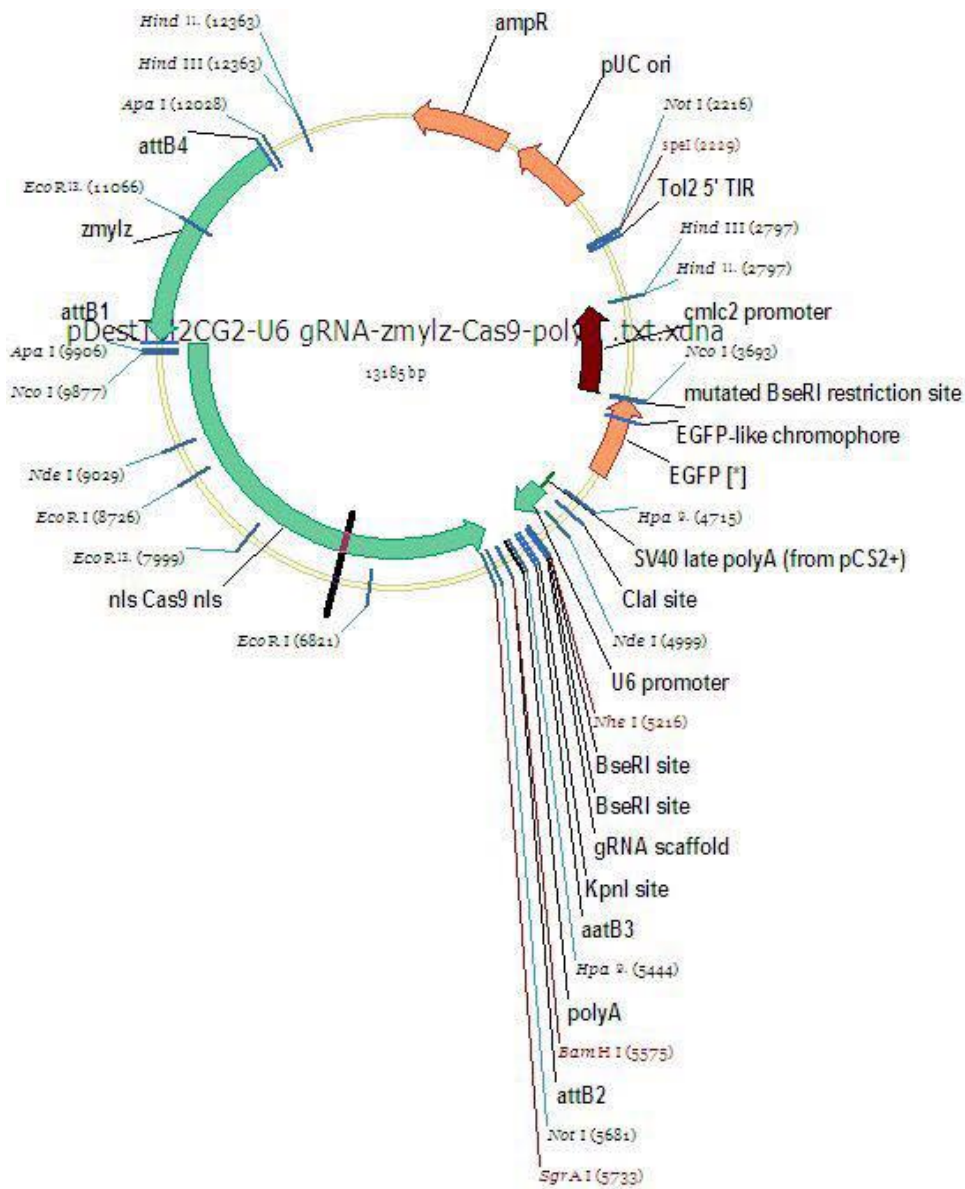
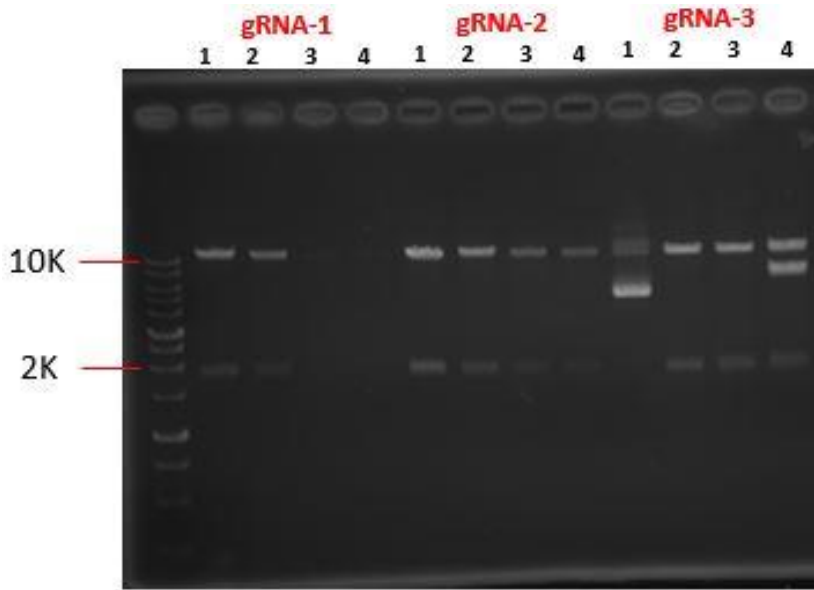


Fig. 9 pDest Tol2CG2-U6 gRNA - zmylz-Cas9-polyA質體圖

(A)



(B)

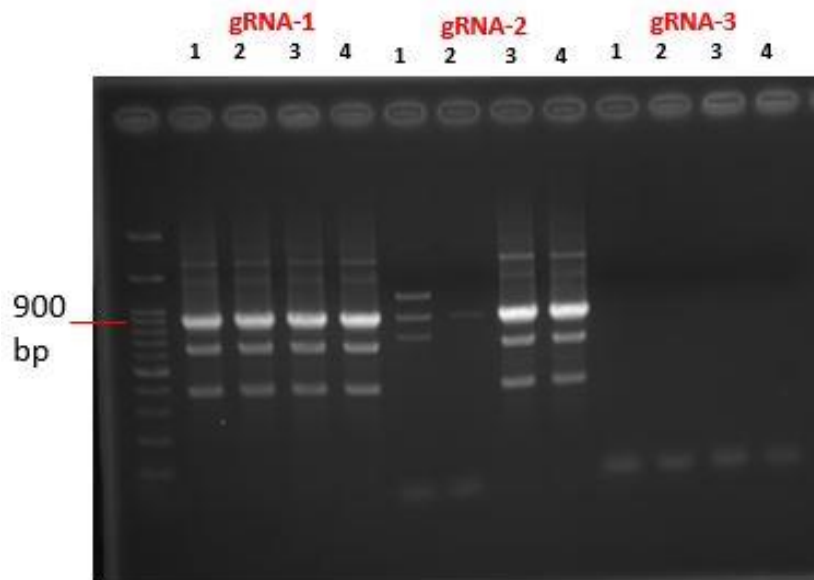


Fig. 10 (A) 將接入gRNA的質體使用EcoR1-HF進行酵素切，選擇跟預期長度11K+2K符合的質體。(B) 將接入gRNA的質體使用primer(ZF1+antisense)進行PCR後選擇符合預期長度888bp的質體。

(七) 參考文獻

1. G. Meola, "Clinical aspects, molecular pathomechanisms and management of myotonic dystrophies," *Acta Myol.*, vol. 32, no. 3, pp. 154–165, 2013.
2. D. H. Cho and S. J. Tapscott, "Myotonic dystrophy: Emerging mechanisms for DM1 and DM2," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1772, no. 2, pp. 195–204, 2007.
3. J. Pettersson, L. Aagaard, T. G. Jensen, and C. K. Damgaard, "Molecular mechanisms in DM1 -- a focus on foci," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 4, pp. 2433–2441, 2015.
4. E. P. Foff and M. S. Mahadevan, "Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1.," *Muscle Nerve*, vol. 44, no. 2, pp. 160–169, 2011.
5. C. L. Liquori, K. Ricker, M. L. Moseley, J. F. Jacobsen, W. Kress, S. L. Naylor, J. W. Day, and L. P. Ranum, "Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9.," *Science*, vol. 293, no. 5531, pp. 864–867, 2001.
6. Kalsotra, A., et al., MicroRNAs coordinate an alternative splicing network during mouse postnatal heart development. *Genes Dev*, 2010. 24(7): p. 653-8.
7. Kalsotra, A., et al. The Mef2 Transcription Network Is Disrupted in Myotonic Dystrophy Heart Tissue, Dramatically Altering miRNA and mRNA Expression. *Cell Rep*, 2014. 6(2): p. 336-45.
8. C.-R. Liu, C.-R. Chang, Y. Chern, T.-H. Wang, W.-C. Hsieh, W.-C. Shen, C.-Y. Chang, I.-C. Chu, N. Deng, S. N. Cohen, and T.-H. Cheng, "Spt4 is selectively required for transcription of extended trinucleotide repeats.," *Cell*, vol. 148, no. 4, pp. 690–701, Feb. 2012.
9. J. Pettersson, L. Aagaard, D. Andrejeva, R. Thomsen, T. G. Jensen, and C. K. Damgaard, "DDX6 regulates sequestered nuclear CUG-expanded DMPK-mRNA in dystrophia myotonica type 1.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 11, pp. 7186–200, Jan. 2014.
10. F.-X. Laurent, A. Sureau, A. F. Klein, F. Trouslard, E. Gasnier, D. Furling, and J. Marie, "New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 7, pp. 3159–71, Apr. 2012.
11. T. E. Ki, T. I. Shihara, I. K. Atsura, and F. H. Anaoka, "A Genome-wide Survey and Systematic RNAi-based Characterization of Helicase-like Genes in *Caenorhabditis elegans*," pp. 183–199, 2007.
12. Y. Wu, "Unwinding and rewinding: Double faces of helicase?," *J. Nucleic Acids*, vol. 2012, 2012.

13. S. S. Patel and I. Donmez, "Mechanisms of helicases," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 27, pp. 18265–18268, 2006.
14. Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish*. 2009;6:69–77. doi: 10.1089/zeb.2008.0555.
15. Jiang W1, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. 2013 Mar;31(3):233-9.doi: 10.1038/nbt.2508.